

УДК 577.29

Реконструкция реакции модификации лантибиотика андалусицина лантионинсинтетазой AncKC в гетерологической системе *Escherichia coli*

Н. З. Мирзоева¹, С. О. Пипия¹, Ю. А. Мокрушина^{1,2}, М. В. Серебрякова³, А. А. Григорьева^{4,5}, С. А. Дубилей^{4,5}, С. С. Терехов¹, И. В. Смирнов^{1,2*}

¹Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

⁴Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

⁵Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: ivansmr@inbox.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023

Принята к печати 13.09.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27347

РЕФЕРАТ Возрастающая устойчивость микроорганизмов к антибиотикам требует поиска новых антимикробных средств. Пептиды, благодаря своей генетически кодируемой природе, являются перспективными кандидатами на роль новых антимикробных препаратов. Лантипептид андалусицин обладает выраженной антимикробной активностью против грамположительных бактерий, поэтому он может рассматриваться как перспективная матрица для создания ДНК-кодируемых библиотек лантибиотиков. Проведена реконструкция реакции модификации андалусицина лантионинсинтетазой III класса AncKC в гетерологической системе *Escherichia coli*. Полученные результаты открывают возможности создания новых антимикробных агентов пептидной природы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА лантипептиды, посттрансляционные модификации, антимикробные пептиды.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых антимикробных препаратов является одной из наиболее актуальных проблем, стоящих перед исследователями в 21 веке. Стремительное распространение бактериальных штаммов с множественной лекарственной устойчивостью сопряжено с рисками для общественного здоровья и требует особого внимания. Пептиды являются привлекательными кандидатами на роль новых антибиотиков благодаря своей генетически кодируемой природе, которая позволяет создавать искусственное разнообразие потенциальных антимикробных средств [1, 2].

Лантипептиды – это группа пептидов грамположительных бактерий, которые синтезируются на рибосомах и подвергаются посттрансляционным модификациям. К посттрансляционным модификациям лантипептидов относится дегидрата-

ция остатков Ser и Thr до дегидроаланина (Dha) и дегидробутирина (Dhb) с последующей циклизацией путем образования внутримолекулярных тиоэфирных связей через остаток Cys, вследствие чего образуются неканонические аминокислоты лантионин (Lan) и метил-лантионин (MeLan) [3]. Лантипептиды синтезируются в виде препептида, состоящего из С-концевой последовательности, которая подвергается посттрансляционным модификациям, и N-концевого лидерного пептида, который распознается ферментами модификации и затем удаляется путем протеолиза [4]. Наибольший интерес вызывают лантипептиды, обладающие антимикробной активностью, которые принято называть лантибиотиками [5]. Классификация лантипептидов основана на различиях в строении и механизмах работы ферментов, осуществляющих посттрансля-

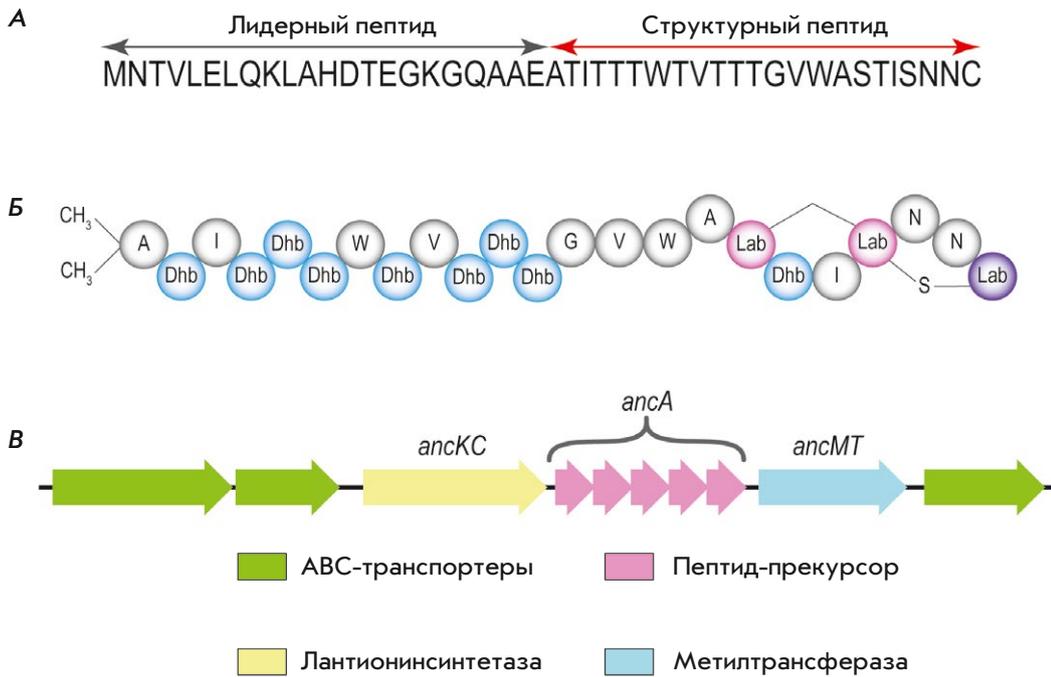


Рис. 1. Структура лантипептида андалусицин: **A** – первичная структура андалусицина; **Б** – структура зрелого андалусицина; **В** – схематичное изображение кластера биосинтеза андалусицина

ционную модификацию лантипептидов. До недавнего времени выделяли IV класса лантипептидов, однако последние открытия позволяют выделить новый V класс [6].

Лантипептид андалусицин был выделен из бактерии *Bacillus thuringiensis SV andalusiensis* B23193 (рис. 1) [7]. Кластер биосинтеза андалусицина содержит гены лантионинсинтетазы III класса AncKC, осуществляющей посттрансляционную модификацию лантипептидов; метилтрансферазы, осуществляющей метилирование; и ABC-транспортеров, осуществляющих экспорт лантипептидов во внеклеточную среду. Зрелый диметилированный андалусицин обладает выраженной антимикробной активностью в отношении многочисленных видов бактерий рода *Bacillus*, включая *B. cereus*, вызывающие выраженные токсикоинфекции у человека. Наличие в структуре лабионинового кольца, характерного

только для лантипептидов III класса, делает андалусицин особенно интересным объектом для создания искусственного разнообразия антимикробных пептидов и пептидных молекул с улучшенными свойствами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструирование плазмиды и трансформация бактериальных клеток

Гены *ancKC* и *ancA* были получены путем химического синтеза и обработаны эндонуклеазами рестрикции, а затем лигированы в вектор pIvI-HisTEV (рис. 2).

В качестве штамма-продуцента были выбраны клетки *E. coli* BL21 (DE3). Полученную генетическую конструкцию использовали для химической трансформации бактерий. Экспрессия генов, со-

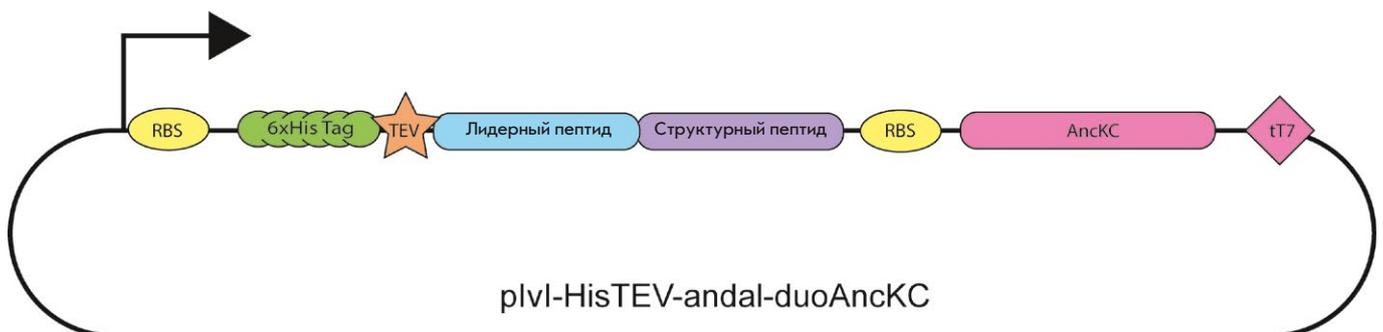


Рис. 2. Схематичное изображение генетической конструкции, содержащей транскрипционную единицу биосинтеза андалусицина

держатся в конструкции, приводила к совместной продукции препептида и лантионинсинтетазы AncKC, что обеспечивало внесение посттрансляционных модификаций *in vivo*. Трансформированные клоны отбирали на чашках Петри с агаризованной средой 2xYT (16 г/л Триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl) с добавлением ампициллина до концентрации 100 мкг/мл.

Наработка модифицированного андалусицина

Единичная колония штамма-продуцента была выбрана для наращивания в 10 мл жидкой среды 2xYT при 37°C в течение ночи. Для инокуляции 100 мл жидкой среды 2xYT использовали 1 мл ночной культуры. Клетки культивировали при 37°C при перемешивании до достижения $OD_{600} = 0.4-0.6$, после чего добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали клетки при 18°C в течение 18 ч и постоянном перемешивании. По окончании экспрессии клеточную массу осаждали центрифугированием.

Очистка рекомбинантного модифицированного андалусицина

Клеточную массу дезинтегрировали ультразвуком, а затем центрифугировали на скорости 12000 об/мин в течение 20 мин. Использовали лизирующий буфер: 20 мМ Трис-НСl pH 8.0, 500 мМ NaCl. Андалусин очищали методом металл-хелатной хроматографии с использованием сорбента Ni-NTA (Qiagen, Германия). Для хроматографической очистки пептида использовали буфер нанесения (20 мМ Трис-НСl pH 8.0, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола) и элюирующий буфер (20 мМ Трис-НСl pH 8.0, 500 мМ NaCl, 300 мМ имидазола). Пробы после хроматографической очистки анализировали с помощью денатурирующего трицинового электрофореза в полиакриламидном геле [8].

Масс-спектрометрический анализ

Для масс-спектрометрического анализа образцы обрабатывали йодацетамидом и подвергали трипсинолизу (Promega, США). Затем 0.5 мкл образца смешивали с 0.5 мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (40 мг/мл в 30% ацетонитриле, 0.5% ТФУ, Sigma Aldrich) на мишени и высушивали.

Масс-спектры получали на MALDI-время-пролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme BrukerDaltonics (Германия) в режиме положительных ионов. Для получения спектров протеолитических пептидов использовали рефлектрон; точность моноизотопных масс однозарядных протонированных ионов была в пределах 0.005% (50 ppm). Спектры фрагментации снимали в tandemном ре-

жиме с точностью измерения фрагментных ионов не ниже 1 Да. Идентификацию пептидов проводили по объединенным данным пептидного фингерпринта и спектров фрагментации отдельных пептидов с помощью программ FlexAnalysis 3.3 и Biotoools 3.3 (Bruker Daltonics). При помощи программы Mascot 2.3.02 проводили поиск в домашней базе данных, куда предварительно вносили последовательности предполагаемых белков с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха, возможной модификации остатков Cys йодацетамидом либо β -меркаптоэтанолом, возможного дегидрирования остатков Ser и Thr, возможного фосфорилирования остатков Ser и Thr. Кандидатные белки, имеющие $score > 56$, считали определенными достоверно ($p < 0.05$). Дополнительно спектры размечали вручную.

Анализ уровня антимикробной активности

Уровень антимикробной активности анализировали, используя метод диффузии в агаре на чашках Петри с агаризованной средой 2xYT без добавления антибиотика. Колонию *B. cereus* ATCC 4342 наращивали в 10 мл жидкой среды 2xYT при 37°C в течение ночи. После чего с помощью ватного тампона, смоченного в ночной культуре тестовой бактерии, получали бактериальный газон на поверхности агаризованной среды.

Образец модифицированного прекурсора андалусицина обрабатывали протеазой Glu-C (NEB, США) для удаления лидерной последовательности. Полученную реакционную смесь наносили каплями на подготовленные чашки Петри, предварительно поделенные на равные сегменты таким образом, чтобы капли содержали 8, 4, 2, 1 и 0.5 мкг структурного пептида модифицированного андалусицина. Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение ночи, после чего выявляли зоны ингибирования роста бактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Андалусин – лантипептид III класса – состоит из 23 аминокислотных остатков и содержит в своем составе лабиониновое кольцо, которое образуется в результате посттрансляционной модификации пептида-прекурсора лантионинсинтетазой AncKC. Андалусин проявляет выраженную антимикробную активность против *B. cereus* ATCC 4342, что делает его интересным объектом для дальнейшего изучения.

В ходе исследования получена генетическая конструкция, объединяющая в единой рамке считывания гены препептида андалусицина и лантионинсинтетазы AncKC. В результате химической

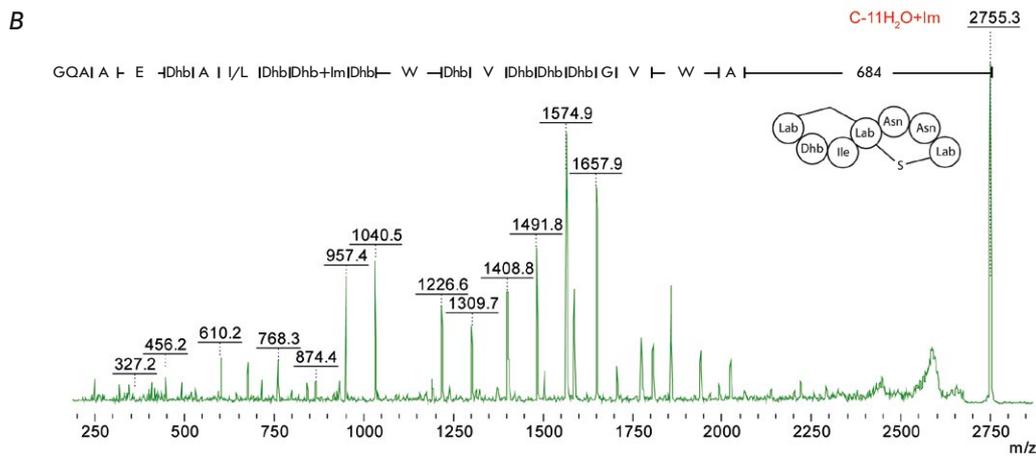
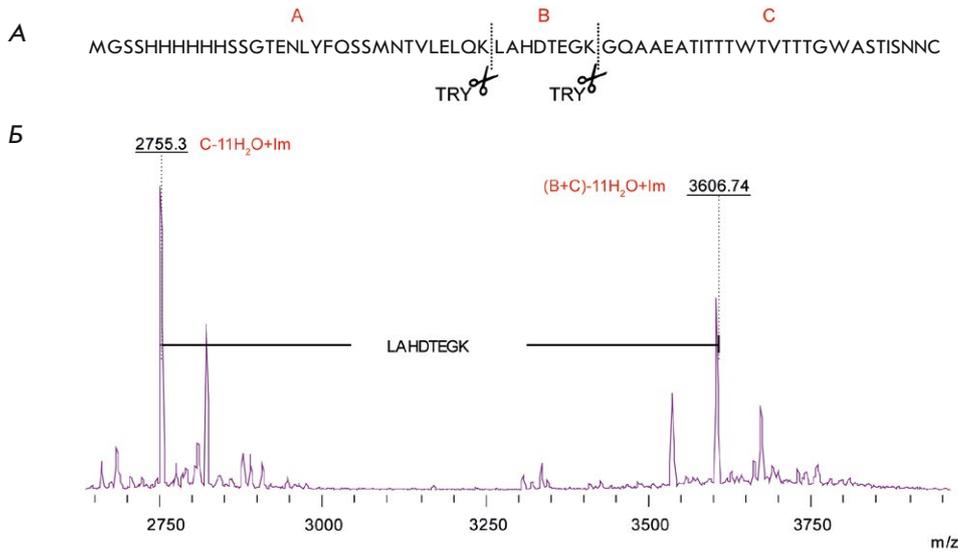


Рис. 3. Масс-спектрометрический анализ рекомбинантного препептида андалусицина: **A** – структура препептида андалусицина с указанием сайтов протеолиза; **Б** – масс-спектр препептида андалусицина после обработки трипсином; **В** – спектр фрагментации иона 2755.3 Да

трансформации клеток *E. coli* BL21 (DE3) получен штамм-продуцент модифицированного препептида андалусицина.

Для подтверждения успешной реконструкции реакции модификации анализировали профиль модификаций наработанного препептида андалусицина. Наиболее чистые фракции продукта использовали для проведения масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ показал наличие молекулярных ионов с массой 3606.74 и 2755.28 Да (рис. 3Б). Ион с массой 3606.74 Да соответствует модифицированному полипептиду, расщепленному трипсином по Lys31 (фрагмент В+С), а ион с массой 2755.28 Да – по Lys39 (фрагмент С). Для дальнейшего исследования структуры андалусицина использовали фрагментацию иона фрагмента С (рис. 3В).

Анализ спектра фрагментации данного молекулярного иона позволил установить аминокислотную последовательность модифицированного пептида

и идентифицировать 11 остатков дегидроаминокислот. Наличие $\Delta m/z$ 683.84 Да на спектре фрагментации между молекулярным ионом и первым фрагментным ионом соответствует лабиониновому кольцу на С-конце андалусицина. Отсутствие фрагментации в этой части спектра свидетельствует о конформационной жесткости структуры.

Уровень антимикробной активности аналога андалусицина анализировали методом диффузии. В качестве модельного организма использовали штамм *B. cereus* ATCC 4342. Полученные результаты указывают на антимикробную активность в 20 ± 10 раз меньше, чем у зрелого природного андалусицина, что, вероятно, обусловлено отсутствием двух метильных групп на N-конце структурного пептида у полученного аналога (рис. 4).

Таким образом, показано, что AncKC вносит в предшественник андалусицина посттрансляционные модификации, соответствующие

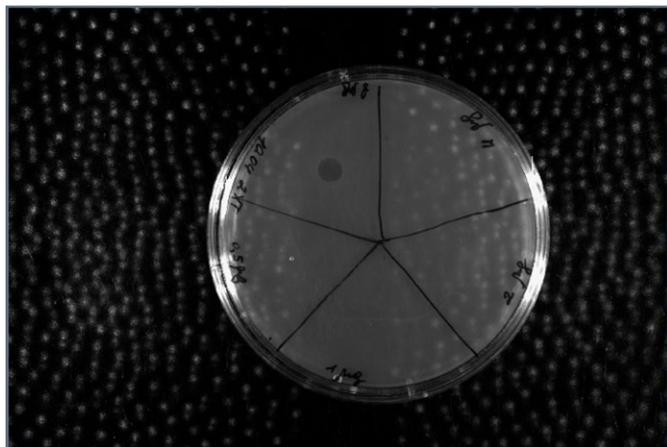


Рис. 4. Определение активности аналога андалусина с использованием метода диффузии в агаре. В качестве модельного организма использовали *B. cereus* ATCC 4342

аналогичным модификациям природного пептида, что обусловлено успешной реконструкцией этой реакции в гетерологической системе *E. coli*. Наличие минимальной антимикробной активности также указывает на успешную модификацию аналога андалусина. Присутствие в структуре дегидроаминокислот в совокупности с лабиониновым кольцом на С-конце лантипептида обеспечивает связывание с одним из ключевых компонентов биосинтеза бактериальной клеточной стенки – липидом II.

Результаты данного исследования расширяют наше представление о лантипептидах III класса и открывают новые возможности для направленной модификации рекомбинантных антимикробных пептидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка новых антимикробных препаратов – одна из ключевых задач современности. Пептиды являются перспективными кандидатами на роль новых антибиотиков. В частности, некоторые представители лантипептидов демонстрируют выраженную антимикробную активность, что, вместе с уникальными посттрансляционными модификациями, делает их интересными объектами для исследований. Нами получена генетическая конструкция, объединяющая гены лантионинсинтетазы III класса АнсКС и лантипептида андалусина, позволяющая осуществлять совместную наработку и модификацию пептида в гетерологическом продуценте *E. coli* BL21 (DE3). Масс-спектрометрический анализ рекомбинантного препептида андалусина подтвердил внесение посттрансляционных модификаций, соответствующих модификациям в природном андалусине. Полученные результаты расширяют пространство возможностей для использования лантипептидов в области поиска и создания новых антибиотиков. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-14-00331.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hudson G.A., Mitchell D.A. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2018. V. 45. P. 61–69.
- Wang L., Wang N., Zhang W., Cheng X., Yan Z., Shao G., Wang X., Wang R., Fu C. // *Signal Transduct. Target Ther.* 2022. V. 7. № 1. P. 48.
- Repka L.M., Chekan J.R., Nair S.K., van der Donk W.A. // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. № 8. P. 5457–5520.
- Zhang Q., Yang X., Wang H., van der Donk W.A. // *ACS Chem Biol.* 2014. V. 9. № 11. P. 2686–2694.
- Schnell N., Entian K.D., Schneider U., Götz F., Zähler H., Kellner R., Jung G. // *Nature.* 1988. V. 333. № 6170. P. 276–278.
- Ortiz-López F.J., Carretero-Molina D., Sánchez-Hidalgo M., Martín J., González I., Román-Hurtado F., de la Cruz M., García-Fernández S., Reyes F., Deisinger J.P., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2020. V. 59. № 31. P. 12654–12658.
- Grigoreva A., Andreeva J., Bikmetov D., Rusanova A., Serebryakova M., Garcia A.H., Slonova D., Nair S.K., Lippens G., Severinov K., et al. // *iScience.* 2021. V. 24. № 5. P. 102480.
- Schägger H. // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. № 1. P. 16–22.